

**Nachweis von Isoenzym polymorphismen an
fixiertem Muskelgewebe am Beispiel des
PGM₁-System**

Bärbel Bernhardt

Disbui. München
1988



Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Spann

Nachweis von Isoenzym polymorphismen an fixiertem
Muskelgewebe am Beispiel des PGM₁-System

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bärbel Bernhardt

aus
Coburg
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Spann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Edith Tutsch-Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung 25.02.1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I Einleitung	3
II Merkmale der Phosphoglucomutase	6
1. Biochemie	6
2. Genetik	8
3. Verteilung	10
III Material und Methode	12
1. Fixation	12
2. Materialgewinnung	15
3. Hämolysatherstellung	16
4. Methode der IEF	17
4.1 Theoretische Grundlagen	17
4.2 Praktische Durchführung	22
5. Enzymspezifische Färbung	24
IV Ergebnisse	26
V Diskussion	32
VI Zusammenfassung	35
VII Literaturverzeichnis	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555225_0101

I. EINLEITUNG

Eine zentrale Aufgabe für die Arbeit des Gerichtsmediziners stellt, nicht zuletzt im Rahmen zunehmender Massenkatastrophen, die Frage der Identifizierung und Zuordnung von Leichenteilen dar. Ausgedehnte traumatische Verletzungen können von vornherein eine Blutgewinnung erschweren oder unmöglich werden lassen, weshalb dem Auffinden von Blutmerkmalen am Gewebe zum Ziel eines individuellen Prägungsnachweises eine große Bedeutung zukommt.

Hierzu stehen neben den ABO - Merkmalen und Gm- wie InV-Faktoren, zu deren Nachweisbarkeitsgrenzen und Stabilität zahlreiche Untersuchungen vorliegen, in neuerer Zeit auch Enzymgruppen, zum Beispiel der PGM, der GPT, der GLO und EsD zur Verfügung, wobei gerade die PGM auf Grund der hohen Aussagekraft und der bekannten Stabilität an gealterten Blutproben, zunehmend auch für die Spurenkunde eine führende Stellung gewinnt.

Die Phosphoglucomutase wird in nahezu allen Körpergeweben und Sekreten nachgewiesen. Bereits zur ersten Veröffentlichung ihres Polymorphismus durch Spencer und Hopkinson 1964 (16) konnte sie in der Stärkegelelektrophorese nicht nur an Hämolysaten isolierter Leukozyten, sondern auch an Homogenisaten der menschlichen Leber, Niere, Herzmuskulatur, Uterus, Gehirn, Haut und Plazenta beschrieben werden.

Man erklärte sich die drei damals bekannten Phänotypen PGM_1^1 , PGM_1^{2-1} und PGM_1^2 als Produkte zweier an einem autosomalen Genlocus existierenden Allele. Hopkinson und Harris erweiterten jenes Modell in den Jahren 1966 und 1968, indem sie zwei weitere Genorte (PGM_2 und PGM_3) mit von ihnen ausgehenden schneller wandernden Isoenzymzonen nachwiesen.(8) In vielfältigen Untersuchungen bestätigte Oepen 1973 jene Ergebnisse für PGM_1 und PGM_2 an Haut, Muskulatur, Milz und Niere, hierbei bereits erfolgreich Bedingungen erprobend, die sich auf eine Lagerungszeit von bis zu zwei Wochen unter Raumtemperatur, fünf Wochen unter fließendem Wasser sowie 24h bei 37° C erstreckten.(12)

Im Zuge der Entwicklung und Verfeinerung der Isoelektrischen Fokussierung durch Awdeh et al. 1968 und Vesterberg 1973 erfuhr das PGM_1 - System in der grundlegenden Arbeit von Bark et al. 1976 seine bis heute gültige Unterteilung in zehn Phänotypen, die sich von vier häufigen Allelen am ersten Genort ableiten lassen.(2)

Zahlreiche Untersuchungen folgen, die sich bemühen, die Einsatzmöglichkeit verschiedener Enzymsysteme in der forensischen Serologie unter ihrer zeitlichen Nachweisbarkeitsgrenze bei wechselnden Materialbedingungen zu bestimmen.

Zu nennen wären hier u.a. die Arbeiten von Hoste und Mitarbeiter, Stöhlmacher und Haferland sowie Oya und Tutsch-Bauer. (9, 14, 18, 21) Ersterer verwendete neben Muskulatur auch verschiedene Organe, die als tiefgefrorene Gewebeschnitte mit Kochsalz versetzt homogenisiert wurden. Er berichtet über gute Ergebnisse bzgl. des EsD-, GLO- und PGM-Systems, insbesondere an der Muskulatur. Stöhlmacher und Haferland arbeiteten mit nativen Gefrierschnitten, vor allem aus Skelettmuskulatur. Bei einer Lagerungszeit der Gewebesblöcke von -20°C bis ca. 6 Wochen zeigten sich kräftig ablesbare Zymogramme. Oya und Tutsch-Bauer konnten eine PGM-Typisierung am unfixierten Muskel nach einer Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials von einer Woche bei Zimmertemperatur nachweisen.

In Hinblick auf jene zeitlich eingeschränkte Verwendungsmöglichkeit von Gewebematerial, war Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Fixationslösung zu finden, unter der die Enzymaktivität serologisch wichtiger Enzymsysteme, hier der PGM₁, nicht zerstört würde.

Die Fixation sollte dem Enzym zu einer Unlösbarkeit verhelfen, ohne seine Aktivität zu beeinträchtigen. Ebenso wenig sollte das Enzym seine Spezifität verlieren.

II. MERKMALE DER PHOSPHOGLUCOMUTASE

1. Biochemie

Die Phosphoglucomutasen gehören zur Gruppe der Phosphotransferasen. Sie katalysieren unter Anwesenheit von Mg^{2+} und Glucose-1,6-Diphosphat als P-Donator den reversiblen Phosphattransfer im Glucosemolekül von Position 1 auf Position 6.

Das Reaktionsgleichgewicht liegt mit 94% auf Seiten des Glc-6-P-Moleküls, was es als Schlüsselsubstanz für die sich nun teilenden Wege im Kohlehydratstoffwechsel ausweist.

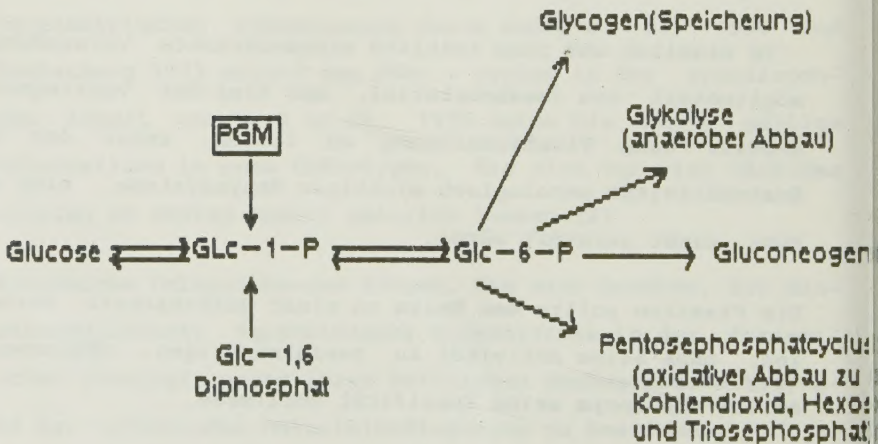
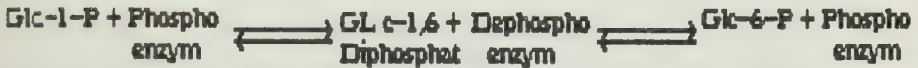


Abb.1: Stoffwechselwege der Glucose

Diese Reaktion nutzt man auch zur enzymspezifischen Färbung. (siehe Punkt 5)



Bei den Phosphoglucomutasen handelt es sich um Isoenzyme. Darunter versteht man Enzyme, die einerseits die gleiche chemische Reaktion katalysieren, jedoch oft unterschiedliche Affinität zum Substrat oder Kinetik besitzen. Ihre differierenden chemischen und physikalischen Merkmale ermöglichen es, sie voneinander zu unterscheiden. Dem liegt zunächst eine unterschiedliche Primärstruktur zu Grunde (Aminosäuresequenz) und in deren Folge unterschiedliches Molekulargewicht, elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (elektrische Ladung), Enzymaktivität etc.

Ursächlich können für die Entstehung von Isoenzymen mehrere Genorte verantwortlich sein, die strukturell unterschiedliche Proteinketten kodieren (z.B. PGM_1 , PGM_2 , PGM_3), ebenso gut aber auch das Auftreten eines multiplen Allelismus an einem einzelnen Genlocus, so daß erneut unterschiedliche Proteinketten resultieren (z.B. PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-}). (2, 17, 20)

Weiterhin lassen sich sogenannte Sekundärenzyme beschreiben. Sie werden als Ergebnisse eines Alterungsprozesses gesehen, der sich an den jeweilig entsprechenden Primärenzymen abspielt (Bande a bzw. b für PGM_1^1 bzw. PGM_1^2) (6). Dabei erhalten diese über eine mögliche Oxidation von Sulfhydrylgruppen oder unterschiedlicher Molekülkonformation eine mehr negative Ladung und somit anodale elektrophoretische Mobilität, die sich als c- bzw. d- Bande für PGM_1^1 bzw. PGM_1^2 widerspiegelt.

Danach wird ein relativ junges Gewebe nur recht schwache Sekundärbanden zeigen, während das Verteilungsbild um so symmetrischer wird, als je älter sich das Gewebe erweist (17).

2. Genetik der PGM_1 ,

Wie eingangs bereits erwähnt, lassen sich mit Einführung der Isoelektrischen Fokussierung die bisher in der Stärkegelelektrophorese bekannten häufigen, auf zwei Allele zurückzuführenden Phänotypen $\text{PGM}_1^{1,2-1,2}$ in zehn Subtypen aufsplittern (nach einem Modell von Bark et al. und Kühnl et al. 2, 17).

Dabei erfolgt eine Auftrennung der a-Bande des PGM_1^1 -Produktes und die b-Bande des PGM_1^2 -Genproduktes in jeweils 2 Banden 1+ und 1- bzw. 2+ und 2-. Diese Isoenzyme zeigen in der Stärkegelelektrophorese gleiche Mobilität, während sie mit der Isoelektrischen Fokussierung infolge unterschiedlicher elektrischer Ladung getrennt werden.

Dabei liegen genetisch vier Allele vor, mit zehn möglichen Phänotypen, wobei die Summe aus $\text{PGM}_1^{1+} + \text{PGM}_1^{1-}$ gleich dem PGM_1^1 der Stärkegelelektrophorese und die Summe aus $\text{PGM}_2^{2+} + \text{PGM}_2^{2-}$ dem PGM_2^2 der SGE entspricht. Eine entsprechende Unterteilung gilt für die zugehörigen Sekundärbanden c und d, die sich allerdings allgemein schwächer darstellen.

Das Genprodukt 1+ ist insofern gekennzeichnet durch je eine anodennahe Bande a+ (Primärenzym) und c+ (Sekundärenzym), 1- durch eine kathodennahe Bande a- (Primärenzym) und c- (Sekundärenzym). Für 2+ sind je eine anodennahe Bande b+ und d+, für 2- je eine kathodennahe Bande b- und d- zu sehen.

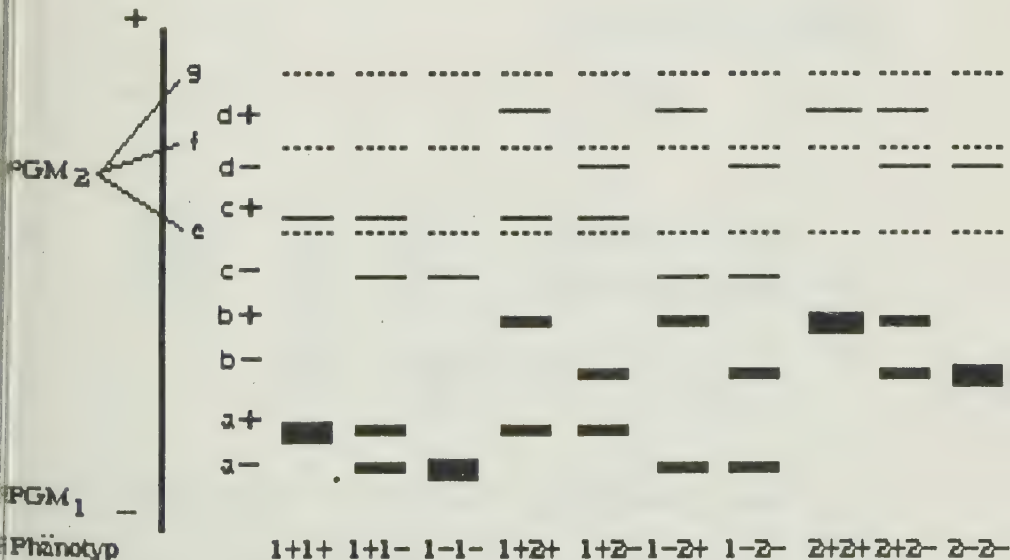


Abb. 2: Schematische Darstellung der PGM₁-Subtypen nach

3. Verteilung

Einen Überblick über die prozentuale Verteilung der Gen- wie Phänotypfrequenzen des PGM₁-Systems in der Bevölkerung zeigt die anschließende Tabelle, die die Grundlage der bio-statistischen Wahrscheinlichkeitsberechnung im Rahmen der Vaterschaftsbegutachtung darstellt.(7)

Leider differieren unter den Autoren nach wie vor die Nomenklaturen für die PGM₁-Subtypen, weshalb eine vergleichende Übersicht angefügt wurde.

Tab.1: Gen- und Phänotypfrequenzen des PGM₁-Systems in der Bevölkerung

Anzahl der Gene 4
Anzahl der Phänotypen 10

Gen-Nr.	Gene	Genfrequenzen		
		1)	2)	3)
1	PGM ₁ ¹ ——— 1+	= 1F	= A3	0.13360
2	PGM ₁ ¹ ——— 1-	= 1S	= A1	0.63840
3	PGM ₁ ² ——— 2+	= 2F	= A4	0.05090
4	PGM ₁ ² ——— 2-	= 2S	= A2	0.17710
	Spencer (16)	Bark (2)	Bissbort (4)	Kühnl (17)

1): + bzw. - bezeichnen die anoden- bzw. kathodennahe Bande

2): S=slow; F=fast; d.h. langsam bzw. schnell wandernd in der Stärkegelelektrophorese

3): A1 - A4 bedeutet darstellbar auf Agarose und Poly-acrylamid

Phänotyp-Nr.	Phänotypen					Phänotypfrequenzen
1	PGM ₁	1-1-	= 1F	=	A3	1.78
2	PGM ₁	1-1+	= 1F-1S	=	A3-A1	17.06
3	PGM ₁	1-2-	= 1F-2F	=	A3-A4	1.36
4	PGM ₁	1-2+	= 1F-2S	=	A3-A2	4.73
5	PGM ₁	1+1+	= 1S	=	A1	40.76
6	PGM ₁	1+2-	= 1S-2F	=	A1-A4	6.50
7	PGM ₁	1+2+	= 1S-2S	=	A1-A2	22.61
8	PGM ₁	2-2-	= 2F	=	A4	0.26
9	PGM ₁	2+2-	= 2F-2S	=	A4-A2	1.80
10	PGM ₁	2+2+	= 2S	=	A2	3.14

III. MATERIAL & METHODE

1. Fixation

Grundsätzlich gehen die Anforderungen an eine Fixation dahin, ein Optimum an Strukturhaltung bei unveränderter Gewebelokalisation ohne Beeinträchtigung der Aktivität oder Spezifität der jeweils nachzuweisenden Substanz zu vereinbaren.

Mit Erprobung der einzelnen Fixationsmittel erweist sich diese Vorstellung jedoch oft als widersprüchlich, da manches Fixationsmittel zwar eine befriedigende Festlegung der zu ermittelnden Substanz ermöglicht, sich aber ungeeignet infolge strukturschädigender oder nicht erhaltender Wirkung zeigt. Fixationsmedien, die eine gute Strukturhaltung garantieren, extrahieren möglicherweise die nachzuweisende Substanz oder zerstören sie. So werden praktisch alle Enzyme durch Fixationsmittel inaktiviert.(1,11) Zahlreiche Untersuchungen sind insofern auf die Ermittlung der nach Fixation verbleibenden Aktivität verschiedener Enzyme gerichtet worden. Einige Enzyme, und zwar vor allem die oxidierenden, vertragen keinerlei Fixation. Aber auch die widerstandsfähigeren Fermente, wie Phosphatasen und Esterasen, erfahren eine Minderung der Aktivität. Allerdings ist das Ausmaß der Hemmung innerhalb des Gewebestücks unterschiedlich. Die Aktivitätsminderung variiert in verschiedenen Geweben. Sie wird durch pH, Temperatur und Dauer der Fixation stark beeinflusst.(5, 1)

Wie bei allen Proteinen kann die Fixation das Enzym von seiner Quartär- bis Primärstruktur angreifen. Letztere darf überhaupt nicht beeinflußt werden, aber auch Sekundär- und Tertiärstruktur, an die die Enzymfunktion ebenso maßgeblich gebunden ist, sollten so gering als möglich beeinträchtigt werden.

Denaturierung bezeichnet Vorgänge, die den Verlust der spezifischen räumlichen Anordnung des Proteins, die vorwiegend über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt, herbeiführen.

Hydrophobe Wechselwirkungen bedingen, daß sich die hydrophoben Teile und Seitenketten, auch entfernt liegender Aminosäuren, im Innern des Enzymmoleküls aneinanderlagern, während an der Oberfläche die hydrophilen Seitengruppen mit Wassermolekülen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Bevorzugt liegt das reaktive Zentrum im Enzymmolekülinneren, so daß bei der Substratanlagerung und -umsetzung keine Störung durch Wassermoleküle droht. Mit Änderung der Wasserstruktur durch geeignete Zusätze, wie z.B. organische Fixationsmittel erfolgt eine zunehmende Sprengung von Wasserstoffbrückenbindungen und Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen am Molekül. Damit vollzieht sich die Auflösung der spezifischen Konformation des Proteins, die, erreicht sie das reaktive Zentrum, mit dem Verlust der biologischen Aktivität einhergeht, d.h. dem Unvermögen des Substratumsatzes.

Ähnlich kann man sich den Verlust an Substratspezifität vorstellen, wenn Gruppen für die Substratbindung verantwortlich sind, die in der Polypeptidkette an sich weit auseinander liegen, infolge der dreidimensionalen Raumanordnung des Proteins aber in engem nachbarschaftlichen Bezug stehen.(11)

Da allerdings Denaturierung von Eiweiß kein einzelner, schlagartig einsetzender Prozeß ist und die verschiedenen als Denaturierung bezeichneten Veränderungen nicht bei jeder Fixation das gleiche Ausmaß erreichen, müßte es möglich sein, an jene Fixationsqualität zu gelangen, die das Enzym unlöslich macht, ohne ihm seine Aktivität und Spezifität histochemisch-nachweisbar zu beeinflussen. Einige Fixationsmittel vermögen sehr wohl die Löslichkeit des Fermentes zu manipulieren, ohne dabei die Fermentaktivität respektive Substratspezifität zu zerstören.(5)

2. Materialgewinnung

Kleine Muskelstücke, in der Größenordnung von 2 x 1 cm, wurden anlässlich gerichtlicher Obduktionen aus dem Psoas entnommen, wobei bewußt nicht darauf geachtet wurde, wieviel Zeit zwischen Todeseintritt und Probenentnahme verstrichen war, jedoch, daß die Leiche keine makroskopisch offensichtlichen Fäulniserscheinungen aufwies. Die Gewebestücke wurden unmittelbar nach Gewinnung in Fixierungslösung enthaltende Plastiktüten eingelegt und im Kühlschrank bei 4° C bis zur Verarbeitung gelagert. Als zu erprobende Fixationslösungen wurden 4%-iges Formalin, mit Natriumbikarbonat gepuffertes Formalin, eingestellt auf ph 7,5, 80%-iges Äthanol sowie Aceton herangezogen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde jeweils eine Herzblutprobe mitasserviert, die routinemäßig im Labor mituntersucht wurde.

3. Hämolysatherstellung

2 - 4 ml Blut ohne Zusatz (Nativblut) werden dem Herzbeutel entnommen und bis zur Verarbeitung im Kühlschrank gelagert. Davon werden 0,5 - 1 ml in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und 10 Minuten mit ca. 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die so gewonnene Erythrozytensuspension wird für mind. 1/2 h bei -20° C eingefroren und erneut aufgetaut, wodurch die Erythrozyten zum Platzen gebracht werden und sich die intrazellulären Enzyme freisetzen. Dieses Hämolysat wird mit Filterpapierplättchen 5x7 mm/Whatmann Nr.3 aufgetragen. Sollte es weiterhin für Untersuchungen zur Verfügung stehen, ist eine Aufbewahrung bei -20 ° C wiederum nötig.

4. Methode der Isoelektrischen Fokussierung

4.1 Theoretische Grundlagen

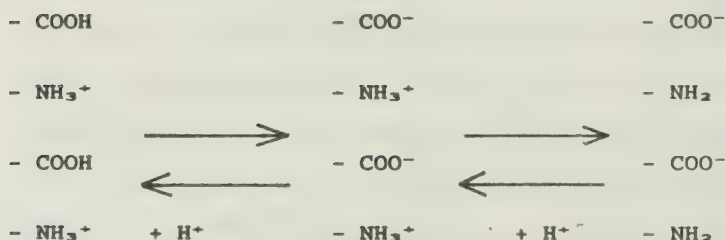
Bei der IEF (Isoelektrischen Fokussierung) handelt es sich um ein hochauflösendes, elektrophoretisches Verfahren, das Proteingemische unter Aufbau eines linearen und stabilen pH-Gradienten nach ihren verschiedenen Isoelektrischen Punkten (pI) trennt.

Ermöglicht wird das zunächst durch den bestehenden Ampholytcharakter aller Proteine, d.h. ihrer zugleich basischen wie sauren Reaktionsmöglichkeit infolge entsprechender Funktionsgruppen an den einzelnen Aminosäuren.

Bringt man ein Protein in ein saures Medium, wird es Protonen aufnehmen und somit eine positive Nettoladung tragen. Im basischen Milieu hingegen resümiert über den Entzug von Protonen eine negative Nettoladung. Jene Änderung der Ladungseigenschaften, entsprechend dem Umgebungs-pH erfolgt an freien Carboxyl-, Amino-, Imidazol- und Guanidinseitengruppen der das Protein bestimmenden Aminosäuren. Für jedes komplexere Molekül ergeben sich insofern in der Regel mehrfach elektrische Ladungen. Dabei heben sich positive und negative Ladungen auf.

Als Nettoladung eines Proteins wird die aus der gegenseitigen Aufsummierung aller positiven wie negativen Ladungen Resultierende bezeichnet. So muß es für jedes Protein auch einen charakteristischen ph-Wert geben, an dem es eine Nettoladung von Null besitzt, sein isoelektrischer Punkt (pI) genannt.

Abb.2: Nettoladung von Ampholyten in verschiedenen ph - Bereichen und am isoelektrischen Punkt (pI) (17)



Saurer Bereich

ph = pI

Alkalischer Bereich

positive
Nettoladung

Nettoladung
= 0

negative
Nettoladung

In der herkömmlichen Elektrophorese wandern mit Anlegen einer elektrischen Spannung in konstanter Pufferlösung entsprechend ihrer Nettoladung negativ geladene Moleküle (Anionen) zur positiven Elektrode (Anode) und positiv geladene Moleküle (Kationen) zur negativen Elektrode (Kathode).

Die Auftrennung erfolgt über ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit, die wiederum vornehmlich von der Größe des Moleküls, der Nettoladung und Stärke des elektrischen Feldes bestimmt wird.

$$v = \frac{Q \cdot E}{G \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

v = Wanderungsgeschwindigkeit
Q = Ladung des Ions
E = Elektrische Feldstärke
r = Radius des Teilchens
 η = Viskosität des Mediums

Besonders bei langsamen Fraktionen infolge kleiner Nettoladung und/oder hohem Molekulargewicht kann es trotz einer schmalen Auftragungszone am Trennstrecken-anfang zu Bandenverbreiterung durch Diffusion und damit einer geringeren Nachweisempfindlichkeit kommen.

Bei der Isoelektrischen Fokussierung wandern die Probenkomponenten mit Anlegen einer elektrischen Spannung entlang einem der Trägermatrix (Gel) zugrundeliegenden pH-Gradienten. Entsprechend dem Auftragungsort wird das Protein in Anodennähe (niedriger pH) eine positive Nettoladung annehmen, in Kathodennähe eine negative, und über schrittweisen Abbau seiner Ladung in Richtung der Elektrode entgegengesetzter Polarität seinen pI erreichen. Hier besitzt es keine Ladung mehr und verliert damit elektrophoretische Beweglichkeit.

Es vermag nur schwer über Diffusion zu entkommen, da eine Entfernung vom pI in mehr basisches oder saures Milieu mit dem Erhalt seiner erneuten Nettoladung einhergeht, die das Protein an seinen pI zurückzwingt. So konzentriert sich bei der IEF jede einzelne Komponente eines Proteingemisches an ihrem spezifischen pI, kaum beeinflusbar durch Diffusion, breitere Bandenauftragung oder Wahl des Auftragungsortes wie bei der Elektrophorese.

Grundlegend für die beschriebene Auftrennung von Proteinen bei der IEF ist das Vorhandensein eines linearen und stabilen pH-Gradienten, über den sich Wanderung wie spezifische Konzentrierung jeder einzelnen Probenkomponente per Ladungsaustausch im angelegten elektrischen Feld vollzieht bzw. erhält. Zu seinem Aufbau bedient man sich Trägerampholyte, die aus einer Vielzahl niedermolekularer Polyaminopolycarbonsäuren bestehen und im gewünschten pH-Bereich eng benachbarte isoelektrische Punkte besitzen. Sie werden einem stabilisierenden Medium (z.B. einem Gel) in mindestens 2% iger Konzentration zugesetzt. Um einem Hinauswandern der Trägerampholyte aus dem Gel vorzubeugen, werden zwischen Gel und Elektroden Filterkartonstreifen gelegt, die mit einer Elektrolytlösung getränkt sind, die einen niedrigeren (Anode) bzw. höheren (Kathode) pH-Wert aufweist als es dem gewählten pH-Bereich entspricht.

Zunächst liegen die Trägerampholyte recht ungeordnet vor, einen konstanten pH-Wert bewirkend, der den Mittelwert des von ihnen gebildeten pH-Bereichs darstellt, wobei praktisch alle eine Ladung zeigen. Jene, deren pI in saurerer Lösung erreicht wäre, eine negative, jene mit pI in basischerem Milieu eine positive. Mit Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Trägerampholyte zur Anode, die positiv geladenen zur Kathode, tauschen ihre Ladungen aus bis ihre Nettoladung gleich Null ist und arrangieren sich so in der Reihenfolge ihrer pIs. Dabei finden sich die Trägermoleküle mit dem niedrigsten pI am anodischen Ende, die mit dem höchsten pI am kathodischen Ende.

Der derart entstandene pH-Gradient (jener Prozess wird auch als Vorfokussierung bezeichnet, da die Trägerampholyte, ähnlich später den Proteinen, an ihren jeweiligen pIs "fokussieren" müssen) bleibt so lange bestehen, wie das elektrische Feld angelegt ist. (10, 11, 17)

4.2 Praktische Durchführung

Die IEF für die PGM₁-Subtypisierung wird auf gebrauchsfertigen Polyacrylamidgelen, sogenannten PAG-plates ph 4 - 6,5 , der Fa. LKB durchgeführt. (10,17)

Jene PAG-plates charakterisieren sich über die Werte ihrer Gelkonzentration T mit 5%, ihres Vernetzungsgrades C mit 3%, einer Ampholytkonzentration von 2% und einer Abmessungsgröße von 245 x 110 x 1 mm. Sie werden direkt, d.h. ohne Unterlage auf den Kühlblock der " Multiphor 2117 " - Elektrofokussierkammer von LKB - aufgelegt, dessen Kühltemperatur mit einem Desaga-Frigostat auf +10° C gehalten wird. Beim Auflegen sollte eine Luftblasenbildung vermieden werden, da sie zu lokaler Überhitzung und Verzerrung der Banden führen kann. Als Elektrodenstreifen dienen bereits zugeschnittene Papierstreifen der Fa. LKB. Für die Anode tränkt man mit 0,1 M Glutaminsäure in 0,5 M Orthophosphorsäure, für die Kathode mit 0,1 M β -Alanin, gelöst in Aqua dest. und legt die Streifen dann entsprechend auf die PAG-plate auf. Die Stromzufuhr erfolgt über Platinelektroden, die gut auf den Kontaktstreifen haften.

Zur Vorfokussierung, die dem Aufbau eines pH -Gradienten innerhalb der Gelmatrix dient, wird das Stromversorgungsgerät - LKB Power supply 2103 - für eine viertel Stunde auf 400 V, 20 W und 25 mA eingestellt.

Anschließend erfolgt die Probenauftragung.

Aus der fixierten Muskulatur werden zuvor mit der Schere reiskorngroße Stücke gelöst und auf einer Glasplatte mit einem Reagenzröhrchen zu dünnen Plättchen ausgerollt.

Infolge Verdunstung der Fixationslösung entstehen harte Muskelplättchen, die in der Dicke den sonst üblichen Filterpapierstreifen entsprechen; anschließend werden sie auf eine Größe von 4 x 5 mm zugeschnitten. Ohne weitere Bearbeitung werden sie jetzt auf die Gelplatten, 2 cm vom Anodenrand entfernt, aufgelegt. Parallel dazu erfolgt die Auftragung der zur Kontrolle mitlaufenden Herzbluthämolysate mit Filterpapierblättchen 5 x 7 mm Whatmann Nr. 3.

Das Stromversorgungsgerät wird nun auf eine

Spannung von 1300 V

Leistung von 30 W

Strom von 60 mA

eingestellt.

Die Fokussierdauer beträgt 3 Stunden, wobei bereits nach einer Stunde die aufgelegten Proben wieder entfernt werden.

5. Enzymspezifische Färbung

Die enzymspezifische Färbung nach Spencer erfolgt als Agarose-Overlay. (15, 16, 20) Ein Teil PGM-Stammlösung der FA. BIOTEST -- Zusammensetzung: 18g Tris, 10g $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 1g Na-Acid mit 0,1 N HCL auf pH 7,9 eingestellt und auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt -- wird mit vier Teilen H_2O zur Puffer-Gebrauchslösung verdünnt.

Lösung 1 : In 35 ml Puffer-Gebrauchslösung werden 500 mg Agarose L (Behringwerke Marburg) aufgekocht.

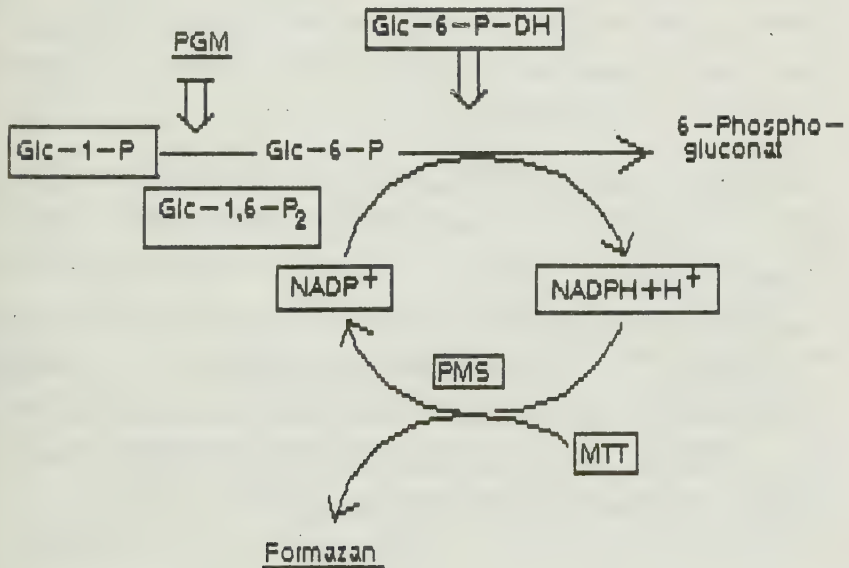
Lösung 2 : In 15 ml Puffergebrauchslösung werden unter Lichtabschluß verrührt :

100	mg	Glucose-1-Phosphat	(Boehringer Mannheim)
0,4	mg	Glucose-1,6-Diphosphat	(Boehringer Mannheim)
10	mg	NADP	(" ")
6	mg	PMS (= Phenazin Methosulfat, Serva Heidelberg)	
6	mg	MTT (= Dimethylthiazolyl-Diphenyltetrazolium-Bromid, Sigma)	
0,02	ml	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	(Boehringer Mannheim)

Nach Abkühlen von Lösung 1 auf ca. 40° C werden beide Lösungen vermischt und über die IEF-Platte gegossen. Das Overlay-Gel erstarrt in kurzer Zeit.

Die Platte wird in einem Wärmeschrank bei ca. 40° C für mindestens 30 min unter Lichtabschluß inkubiert. An den Stellen, an denen PGM-Enzymaktivität vorliegt, zeigt sich ein blauer Formazanniederschlag auf gelbem Hintergrund. Unter Lichteinfluß sind diese Färbesubstanzen nicht stabil, sodaß dann allgemein eine diffuse Blaufärbung eintritt. Bei Aufbewahrung unter Lichtabschluß und Kühlung (4° C) sind die Platten für 24-48h haltbar

Den Reaktionsverlauf erklärt das Schema (die zugefügten Reagentien sind eingerahmt) :



IV. ERGEBNISSE

Es wurden Hämolysate und Muskelproben von insgesamt 20 Obduktionsfällen untersucht, wobei sich die in den beiden folgenden Tabellen aufgeführten Ergebnisse zeigten. (Siehe dort). Die erstmalige Typisierung erfolgte 2-5 Tage nach der Entnahme der Muskelproben, die jeweils sofort in die Fixationslösung eingelegt worden waren. Die in Formalin und gepuffertem Formalin fixierten Muskelproben erbrachten in keinem Fall ein Ergebnis. Die in Aceton und Alkohol fixierten Proben ergaben sämtlich beim erstmaligen Typisieren gleichmäßige, gut ablesbare Zymogramme, wobei die Typen jeweils mit den Kontroll-Hämolysaten übereinstimmten, das Bandenmuster zeigte jedoch durch Veränderungen im c-Bereich ein etwas abweichendes Bild.

Erfolgt die Typisierung nach relativ kurzer Lagerungszeit (bis 2 Wochen nach Probenentnahme und Fixation), so ist zum einen zu beachten, daß die, wie vorher beschrieben, hergestellten Muskelplättchen sehr dünn sein müssen, da sonst zu starke, verlaufende Banden entstehen. Bei längerer Lagerungszeit (2-3 Wochen) müssen dann Muskelplättchen von ca. 2-facher Stärke aufgelegt werden. Zum anderen ist die Färbezeit abhängig von der Lagerungszeit zu variieren.

Die frischen Muskelproben benötigen nur eine ganz kurze Entwicklungszeit: nach ca. 5 min Färbezeit sind die Banden bereits deutlich ablesbar. Es empfiehlt sich bereits nach kurzer Zeit zu überprüfen, inwieweit sich ablesbare Banden zeigen, wobei hier natürlich die Gefahr besteht, daß sich durch den wiederkehrenden Lichteinfall das gesamte Gel blau verfärbt. Bei längerer Lagerung kann die beobachtete Abschwächung der Banden durch eine Verlängerung der Färbezeit etwas ausgeglichen werden, die Einwirkungszeit wurde hier bis auf 2 Stunden ausgedehnt.

Generell zeigten die in Alkohol fixierten Proben sämtlich ein rascheres Abblassen; nach 3 Wochen Lagerungszeit im Fixationsmittel waren die Banden nur noch schwach vorhanden, ohne die entsprechenden Kontroll-Hämolysate nicht mehr sicher typisierbar. Die acetonfixierten Proben erbrachten über einen Zeitraum von 6-8 Wochen nach Fixation gut ablesbare Ergebnisse. Offenkundig wurde, daß die PGM-Enzym-Aktivität offensichtlich in den Proben unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Das Schwanken der PGM-Enzym-Aktivität ist ja bereits von den Scheiden-Sperma-Tupfern her bekannt. Bei den vorliegenden Untersuchungen unterschieden sich bei gleichmäßigen Untersuchungsbedingungen einige Proben bereits nach 3-4 Wochen durch ein deutliches Abblassen, während andere Muskelproben noch nach 6-8 Wochen eindeutig ablesbare Ergebnisse vorwiesen.

Zum Abblassen der Banden ist anzumerken, daß die Banden im a- und b-Bereich gleichmäßig abblaßten. In keinem Fall war ein verstärktes oder auch partielles Abblassen der a- oder b-Bande zu beobachten, so daß nicht davon auszugehen ist, daß es zu einer Fehlablesung kommen kann.

Eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes wurde bei den gelagerten Proben ebensowenig festgestellt; im a-Bereich (1+1+, 1+1-) zeigte sich gegenüber den frischen Kontroll-Hämolysaten weder ein Auswandern der Banden nach kathodal, wie von Berg et al. an gelagerten Blutproben (3) beschrieben, noch wurde im Rahmen der Versuche eine Spaltung der Banden erkannt. Im b-Bereich (2+2+, 2+2-) fanden sich ebenfalls nach längerer Lagerungszeit keinerlei Artefakte, d.h. es kam auch hier zu keiner Aufspaltung der Banden, ebensowenig zu einem anodalen Auswandern, wie gleichfalls von Berg et al. beschrieben. (3) Wie oben bereits erwähnt, unterscheidet sich das gesamte Bandenmuster, das sich von den Muskelproben darstellt, gegenüber dem Bild, das von den Hämolysaten her bekannt ist. Es fehlen die bei den Hämolysaten stark ausgeprägten Banden der Sekundärenzyme, als c- und d-Bereiche bezeichnet, die anodal der b-Bande zu beobachten sind. Da es jedoch bei den gealterten Blutproben zu einer Wanderung dieser Bereiche nach kathodal und zu einer Aufspaltung kommen kann, ergeben sich bei den gealterten Blutproben hieraus erhebliche Ableseschwierigkeiten, die aufgrund des Fehlens dieser Banden bei den Muskelproben nicht auftreten können.

Nachdem vorausgehende Untersuchungen gezeigt haben, daß tiefgefrorene Muskelproben ebenfalls nach längerer Lagerungszeit noch gute Ergebnisse erbringen, wurden auch in vorliegender Arbeit probeweise Muskelproben, die nicht fixiert, doch unmittelbar nach Entnahme bei -20° C tief gefroren worden waren, mituntersucht. Es zeigten sich ablesbare Ergebnisse. Doch bestand von Beginn an die Schwierigkeit, daß größtenteils das Bandenmuster zu stark ausgeprägt und nach kurzer Zeit völlig überfärbt war, so daß eine eindeutige Zuordnung unmöglich geworden war. Desweiteren fiel bei den tiefgefrorenen Muskelproben ein teilweise erheblicher Konzentrationsschwankungsgrad auf. Die fixierten Proben wiesen insgesamt ein wesentlich gleichmäßigeres Bild auf, das wie oben erwähnt, durch Variation von Farbe, Zeit und Probeneinsatz in Abhängigkeit von der Lagerungszeit stabil gehalten werden kann.

		1.Wo	2.Wo	3.Wo	4.Wo	5.Wo	6.Wo	7.Wo	8.Wo
1. Hä	1+1+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
2. Hä	2+2+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
3. Hä	2+2+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-
4. Hä	1+1+	+	+	+	+	(+)	-	-	-
5. Hä	1+1+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-
6. Hä	1+1+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-
7. Hä	1+1+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
8. Hä	1+2+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
9. Hä	1+1-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-
10. Hä	1+2+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
11. Hä	1-2+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
12. Hä	1-2+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-
13. Hä	1+1-	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
14. Hä	1+1+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-
15. Hä	1+1-	+	+	+	(+)	-	-	-	-
16. Hä	1+2+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-
17. Hä	1+2-	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
18. Hä	1+2+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
19. Hä	1+1+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-
20. Hä	1+2+	+	+	+	+	(+)	-	-	-

Tab.2: Resultierender PGM₁-Nachweis der in Alkohol fixierten Muskelpuben bei einer Lagerungszeit von bis zu 8 Wochen.

Hä = Hämolysat

Wo = Woche

+ = nachweisbar

(+) = nicht mehr eindeutig bestimmbar

- = nicht nachweisbar

		1.Wo	2.Wo	3.Wo	4.Wo	5.Wo	6.Wo	7.Wo	8.Wo
1. Hä	1+1+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Hä	2+2+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. Hä	2+2+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
4. Hä	1+1+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. Hä	1+1+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
6. Hä	1+1+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. Hä	1+1+	+	+	+	+	+	+	+	+
8. Hä	1+2+	+	+	+	+	+	+	+	+
9. Hä	1+1-	+	+	+	+	+	+	+	+
10. Hä	1+2+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	-
11. Hä	1-2+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. Hä	1-2+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. Hä	1+1-	+	+	+	+	+	+	+	+
14. Hä	1+1+	+	+	+	+	+	+	+	+
15. Hä	1+1-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
16. Hä	1+2+	+	+	+	+	+	+	+	+
17. Hä	1+2-	+	+	+	+	+	+	+	+
18. Hä	1+2+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
19. Hä	1+1+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
20. Hä	1+2+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.3: Resultierender PGM,-Nachweis der in Aceton fixierten Muskelproben bei einer Lagerungszeit von bis zu 8 Wochen.

Hä = Hämolysat

Wo = Woche

+ = nachweisbar

(+) = nicht mehr eindeutig bestimmbar

- = nicht nachweisbar

V. DISKUSSION

Von den für die Muskelproben eingesetzten Fixationslösungen führten weder handelsübliches Formalin, noch dessen gepufferte Form zu einem Ergebnis.

Offensichtlich zerstört dieses Medium sehr rasch die Enzymaktivität der PGM. Versuchsweise wurde daher den Kontroll-Hämolysaten ein Tropfen Formalin hinzugegeben, der obige Vermutung erhärtete, da die Proben erneut kein Ergebnis erbrachten.

Hingegen zeigten sich gut ablesbare Banden für die in Aceton und Alkohol gelagerten Muskelproben; wobei die Bandenmuster der in Alkohol fixierten Muskulatur schwächer in Erscheinung traten, als jene der in Aceton fixierten.

Die im Aceton erhaltene Enzymaktivität war so stark, daß sie nach Inkubation der IEF-Platte eine möglichst schnelle Ablesbarkeit erforderte: es kam zu einem Überfärben und Ineinanderlaufen der Spots.

Hinsichtlich der Lagerungszeit erbrachten die in Aceton fixierten Proben über einen weit längeren Zeitraum zuverlässigere Ergebnisse als die in Alkohol fixierten. Beide Substanzen ähneln sich in ihren hydrophoben und hydrophilen Anteilen, wobei der Hydroxy-Gruppe R-OH des Alkohols in abgeschwächter Form die Carbonyl-Gruppe $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \\ \text{R} \end{array}$ des Acetons entspricht.

Die somit relative, höhere Lipophilie des Acetons mag verantwortlich sein, daß sich die Denaturierung, die bei beiden Substanzen vorzugsweise über eine Sprengung von Wasserstoffbrückenbindungen (1) abläuft, langsamer vollzieht. Mit dem allmählichen Verlust der Proteinkonformation werden hydrophobe Seitenketten im Enzyminneren, die voneinander das aktive Zentrum bilden (11), in ihrer Anordnung gestört und für Wechselwirkungen mit den hydrophoben Gruppen der Fixationssubstanz zugänglicher, was zum Verlust der biologischen Aktivität führt.

Wie erwähnt, fielen weiterhin in einzelnen Proben unterschiedlich starke Aktivitätsschwankungen auf, die sich in einem vorzeitigen Abblassen der Bandenmuster bemerkbar machten. Bereits aus früheren Erfahrungen an Scheiden-Sperma-Proben ist bekannt, daß sich die PGM-Aktivität in den verschiedenen Geweben und Sekreten individuell erheblich unterscheiden kann, was sich an den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt. Insofern kann eine feste zeitliche Nachweisbarkeitsgrenze nicht angegeben werden.

Im Vergleich mit bei -20° C tiefgefrorenen Muskelproben erweisen sich bezüglich der Lagerungsstabilität die fixierten Muskelproben als nicht viel besser. Da jedoch bei fixierten Proben gleichmäßige Zymogramme zu erhalten sind, die durch Probeneinsatzmenge und Färbezeit stabilisiert werden können, erscheint die Typisierung am fixierten Muskel gegenüber dem tiefgefrorenen deutlich überlegen.

Ein von Berg et al. an gelagerten Blutproben (3) beobachtetes kathodales Auswandern der a-Bande sowie anodales Auswandern der b-Bande oder eine Aufspaltung dieser Bereiche kann für die fixierten Muskelproben nicht bestätigt werden, so daß Ergebnisse an ihnen umso eindeutiger festliegen.

Da praktisch alle Enzyme durch Fixationsmittel inaktiviert werden (1, 4) - wobei wiederum verschiedene Enzyme unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den einzelnen Fixationsmitteln zeigen (1) -, wird stets für den jeweils spezifischen Enzymnachweis das geeignete Fixationsmedium empirisch zu ermitteln sein.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Anlässlich gerichtlicher Obduktionen wurden von 20 Obduktionsfällen Muskelproben asserviert und diese in 4%-igem Formalin, mit Natriumbikarbonat gepuffertem Formalin - eingestellt auf pH 7,5 -, 80%-igem Äthanol sowie Aceton fixiert. Gleichzeitig wurden Kontrollblutproben mit-asserviert.

Die PGM₁-Subtypisierung erfolgte auf PAGIF (Polyacrylamidgelisoelektrofokussierung).

Unter Formalin wie der gepufferten Form davon war auch nach kurzer Lagerungszeit keine PGM₁-Aktivität nachweisbar. Alkohol- und acetonfixierte Muskelproben ergaben dagegen gut ablesbare, gleichmäßige Bandenmuster, die für Aceton bis zu einer Lagerungszeit von 2 Monaten zuverlässig den entsprechenden Kontrollhämolysaten zuzuordnen waren. Da sich unter Alkoholfixation das PGM₁-System in schwächer ausgeprägten Banden darstellt und die Lagerungsstabilität 3-4 Wochen nicht überschreitet, liegt der Vorzug auf Aceton als geeignetem Fixationsmittel für PGM₁.

Bei traumatisierten, ausgebluteten Leichen steht somit über Acetonfixierung eine Möglichkeit zur Verfügung, auch nach längerer Lagerungszeit ein serologisch interessantes System an Untersuchungsmaterial mit der im Strafprozeß erforderlichen Sicherheit nachzuweisen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. M. Arnold: "Chemische Fixierung", in
Histochemie - Grundlagen und Prinzipien
Springer-Verlag Berlin (1968), S. 24-33
2. J.E. Bark, M.J. Harris und M. Firth:
"Typing of the Common Phosphoglucose Variants Using
Isoelectric Focusing - A New Interpretation of the
Phosphoglucose System"
J. Forens. Sci. Soc. (1976) Vol. 16, S. 115-120
3. S. Berg, M.-L. Ladiges und O. Ladiges:
"Der Einfluß von Blutproben und Spurenanalyse auf das
PGM₁- und Gc- Subtypenmuster"
Z. Rechtsmed. (1981) Vol. 87, S. 85-94
4. S. Bissbort, H. Ritter, J. Kömpf:
"PGM₁ - subtyping by means of acid starch gel
electrophoresis"
Hum. Genet. 45, S. 175-177 (1978)
5. H.W. Deane et al.: "Fixation", in
Handbuch der Histochemie Bd. VII/1 Enzyme, S. 14-16
Fischer-Verlag Stuttgart (1962)
6. R.A. Fisher, H. Harris:
"Secondary" isozymes derived from the three PGM loci
Ann. Hum. Genet. 36, S. 69-67 (1972)
7. K. Hummel, P. Ihm, K. Schmidt:
"Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit
Blutgruppenbefunden"
Fischer-Verlag Stuttgart (1971)
8. D.A. Hopkinson and H. Harris:
"A third phosphoglucose locus in man"
Ann. Hum. Genet., Lond. (1968), Vol. 31, S. 359-367

9. B. Hoste, J. Brocteur and A. Andre:
"Choice of the most suitable tissues for blood grouping
of cadavers"
Referate der 7. Internationalen Tagung der Gesellschaft
für forensische Blutgruppenkunde e.V.
Hamburg 25.-29. Sept. 1977
10. P. Kühnl: Elektrofokussierung in der forensischen
Serologie - LKB-Broschüre, Bromma (1979)
11. G. Löffler, P. Petrides, L. Weiss, H. Harper
Physiologische Chemie S. 158-184, 104-125
Springer-Verlag Berlin (1979)
12. I. Oepen:
"AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an der Haut,
Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von
Leichenteilen"
Ger. Med. (1973) Vol. 31, S. 300-306
13. I. Oepen:
"Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe"
Fortschritte der Hämatologie Bd. 4, S. 310-350
J.A. Barth-Verlag Leipzig (1977)
14. M. Oya, A. Kido, N. Komatsu und R. Shibata:
"Die Anwendung der Histoelektrofokussierung zur
Bestimmung der PGM,- Subtypen an menschlichen
Körpergeweben"
Z. Rechtsmed. (1984) Vol. 92, S. 225-230
15. O. Prokop, W. Köhler:
Die menschlichen Blutgruppen
Fischer-Verlag Stuttgart (1986), S. 122- 128
16. N. Spencer, D.A. Hopkinson and H. Harris
"Phosphoglucumutase Polymorphism in Man"
Nature (1964) Vol. 204, S. 742-745
17. W. Spielmann, P. Kühnl: "Phosphoglucumutasen"
Blutgruppenkunde, S. 169-176, 92-94
Thieme-Verlag Stuttgart (1982)

18. P. Stöhlmacher, W. Haferland:
"Histoelektrophorese zur Typisierung von Enzymsystemen
menschlicher Körpergewebe"
Z. Rechtsmed. (1981) Vol. 87, S. 249-252
19. J.G. Sutton:
"Characterisation of the isozymes of phosphoglucomutase
Determined by the first (PGM₁) and second (PGM₂) locus
observed by isoelectric focusing"
Hum. Genet. 47 (1979), S. 279-290
20. J.G. Sutton, R. Burgess:
"Genetic evidence for four common alleles at the
phosphoglucomutase-1 locus (PGM₁), detectable by
isoelectric focusing"
Vox Sang. (1978) Vol. 34, S. 97-103
21. E. Tutsch-Bauer, M. Oya, H.D. Tröger:
"PGM₁-Fokussierung an frischen menschlichen
Körpergeweben und nach Lagerung"
Referate der 9. Internationalen Tagung der Gesellschaft
für forensische Blutgruppenkunde e.V.
Bern 29.09.-03.-10.1981

Herrn Prof. Dr. med. E. Liebhardt danke ich für die
freundliche Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. E. Tutsch-Bauer für
die fortlaufende Unterstützung, sowie für viele anregende
Gespräche während der Durchführung der Versuche und der
schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Ganz herzlich danke ich ebenso Frau Corsebius-Honscheid, die
mir in labor- und versuchstechnischen Fragen stets mit Rat
und Tat zur Seite stand.

LEBENS LAUF

Name	Bärbel Bernhardt
Geburtsdatum	27. März 1960
Geburtsort	Coburg
Eltern	Maximilian Bernhardt Prokurist Traudel Bernhardt, geb. Breithut
Wohnung	8000 München 70 Schmid-Kochel-Str. 2
Schul Ausbildung	Grundschule 1966-1970 Gymnasium 1970-1979 Reifezeugnis Juni 1979 Gymnasium Albertinum in Coburg
Studienbeginn	Wintersemester 1979/80 Universität Erlangen
Studienortwechsel	Wintersemester 1982/83 Ludwig-Maximilian-Univ. München
Ärztliche Prüfung - 3. Abschnitt	April 1986
Approbation	August 1986

HERSTELLUNG

profi

druck GmbH

Adalbertstr. 10 RG

8000 München 40

(089) 39 07 27

